

张根生, 李琪, 黄昕钰, 等. 超高压协同 TG 酶改性蛋清蛋白热诱导凝胶机理 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(14): 81–88. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090063

ZHANG Gensheng, LI Qi, HUANG Xinyu, et al. Mechanism of Ultra-high Pressure and TG Enzyme Modified Thermally Induced Gels of Egg White Protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(14): 81–88. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090063

· 研究与探讨 ·

超高压协同 TG 酶改性蛋清蛋白热诱导凝胶机理

张根生¹, 李琪¹, 黄昕钰¹, 杜一男¹, 费英敏^{2,*}

(1. 哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江哈尔滨 150028;

2. 黑龙江民族职业学院, 黑龙江哈尔滨 150066)

摘要: 为提高蛋清蛋白凝胶性, 本研究以蛋清蛋白 (Egg white protein, EWP) 为研究对象, 通过分析质构、持水性、分子作用力、傅里叶红外色谱、圆二色谱、粒径、电位、巯基含量、表面疏水力及扫描电镜的变化, 探究超高压处理 (Ultra-high pressure, UHP)、谷氨酰胺转氨酶处理 (Transglutaminase, TG) 及超高压协同 TG 酶处理 (Ultra-high pressure synergistic Transglutaminase, UTG) 的蛋清蛋白热诱导凝胶机理及结构的变化。结果表明: UHP-EWP、TG-EWP、UTG-EWP 的硬度、弹性和持水性均有所提高, 疏水相互作用力是维持凝胶的主要作用力; UHP-EWP、TG-EWP、UTG-EWP 的 α -螺旋含量均不同程度下降、 β -折叠含量均上升; UHP-EWP 的平均粒径值下降、电位绝对值下降, TG-EWP、UTG-EWP 的变化与之相反; UHP-EWP、TG-EWP、UTG-EWP 的游离巯基含量上升、总巯基含量下降、表面疏水性升高; 凝胶结构更加致密光滑, 平整度提高。本研究为蛋清蛋白热诱导凝胶改性提供了理论基础及研究思路。

关键词: 蛋清蛋白, 超高压改性, TG 酶改性, 凝胶特性

中图分类号: TS253.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)14-0081-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090063



本文网刊:

Mechanism of Ultra-high Pressure and TG Enzyme Modified Thermally Induced Gels of Egg White Protein

ZHANG Gensheng¹, LI Qi¹, HUANG Xinyu¹, DU Yinan¹, FEI Yingmin^{2,*}

(1. College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150028, China;

2. Heilongjiang Vocational College for Nationalities, Harbin 150066, China)

Abstract: Aiming to improve the gel property of egg white proteins, in this research, taking egg white protein (EWP) as the research object, the changes in texture, water-holding ratio, molecular forces, Fourier transform infrared chromatography, circular dichroism spectrum, particle size, potential, sulphhydryl content, surface hydrophobicity, and scanning electron microscopy were analyzed to explore the mechanism and structural changes of heat-induced gel of EWP after the treatments of Ultra-high Pressure (UHP), Transglutaminase (TG) and Ultra-high Pressure Synergistic Transglutaminase (UTG). The results showed that the hardness, elasticity and water holding capacity of UHP-EWP, TG-EWP and UTG-EWP were all improved, and hydrophobic interaction was the main force to maintain gel. The α -helix content of UHP-EWP, TG-EWP and UTG-EWP decreased, while the β -fold content increased. The average particle size and absolute potential of UHP-EWP decreased, while the changes of TG-EWP and UTG-EWP were opposite. The content of free sulphhydryl groups in UHP-EWP, TG-EWP, and UTG-EWP increased, the content of total sulphhydryl groups decreased, and the surface hydrophobicity increased. The gel structure was more compact and smooth, and the flatness was improved. This research provides a

收稿日期: 2023-09-08

基金项目: 黑龙江省“百千万”工程科技重大专项 (2019ZX07B03-3)。

作者简介: 张根生 (1964-), 男, 硕士, 教授, 研究方向: 农产品研究与综合利用, E-mail: zhanggsh@163.com。

* 通信作者: 费英敏 (1973-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 农产品加工, E-mail: ddhgk@126.com。

theoretical basis and research ideas for the heat induced gel modification of EWP.

Key words: egg white protein; ultra-high pressure modification; transglutaminase modification; gel properties

蛋清蛋白凝胶特性在食品加工中应用广泛,其凝胶网络可以吸附水分提高食品的保水性及肉类的嫩度、吸附风味物质、改善肉类风味、提高食品的黏结性、增稠性等。但天然蛋清凝胶性能不理想,为了改善其凝胶性能,以蛋白质结构为基础,国内外学者对蛋清蛋白改性进行了广泛的研究。目前蛋清蛋白改性应用较多的方法有糖基化、超声波、超高压、TG 酶法等。张根生等^[1]通过低聚半乳糖对蛋清蛋白进行改性,添加 4% 低聚半乳糖,蛋清蛋白凝胶硬度和弹性分别增大 68.30% 和 15.05%。叶钰等^[2]研究了超声波处理对蛋清蛋白凝胶性的影响。不同功率处理下,蛋清凝胶的保水性均增强。200 和 400 W 的超声处理下蛋清蛋白凝胶强度提高,600 W、30 min 的超声处理使蛋清的凝胶强度和稳定性降低。王辉^[3]研究了动态微射流超高压均质对蛋清蛋白功能性质的影响,结果表明随着压力的增大,动态微射流超高压处理蛋清蛋白的凝胶性、成膜性、起泡性、流变性均得到了提升。Iametti 等^[4]在蛋白质中添加蔗糖和氯化钠作为保护剂后进行高压处理,与未添加保护剂相比,蛋白质的凝胶强度和起泡性能均有提升。王然等^[5]使用 TG 酶交联蛋清粉,采用响应面分析法优化了最佳反应条件,在酶添加量 6 U/g,反应时间 3.99 h,温度 35 ℃ 时,蛋清粉的凝胶强度提升至 820 g/cm²。陈杰等^[6]通过 TG 酶交联蛋清蛋白粉提高了凝胶强度,最佳工艺条件为反应 pH5.87、琥珀酰化酪蛋白添加量 2.29%、转谷氨酰胺酶添加量 1.06%、反应温度 40 ℃、反应时间 40 min,凝胶强度提高至 1054.5 g/cm²。

与单一改性方法相比,复合改性方法效率更高。近年来,超高压协同 TG 酶改性蛋白质凝胶性具有开阔的研究前景。超高压作用能够使蛋白质结构适度打开,促进 TG 酶交联作用。王炳智^[7]通过高压及 TG 酶法对小麦面筋蛋白进行处理,结果表明,在 100~400 MPa、10 min 条件预处理下,能够诱导小麦面筋蛋白分子结构发生一定程度的去折叠化,暴露出更多的 TG 酶作用位点,显著增强了小麦面筋蛋白与 TG 酶的交联反应。才卫川等^[8]将 TG 酶添加到鸡胸肉肌原纤维蛋白中,然后进行超高压处理,结果表明,最佳工艺为 pH5.9, TG 酶添加量为 0.5%,压力 432 MPa,保压时间 15 min,此条件下肌原纤维蛋白凝胶强度提升至 255.26 g/cm²,保水性提升至 95.23%。刘勤华^[9]通过超高压处理添加 TG 酶的鸡胸肉。结果表明,随着压力水平的增加, L 值、pH 和 TBA 值呈上升趋势,对失水率的影响并不明显。但关于超高压协同 TG 酶对蛋清蛋白凝胶性能的影响鲜有研究。本实验采用超高压协同 TG 酶改性处理蛋清蛋白热诱导凝胶,探究不同改性方法对蛋清蛋

白凝胶性能的影响及形成机理,为蛋清蛋白凝胶改性的研究提供参考及理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鸡蛋 购于本地超市; TG 酶(100 U/g)、8-苯胺-1-萘磺酸(ANS) 分析纯,源叶生物科技有限公司;磷酸盐缓冲溶液 分析纯,北京兰杰柯科技有限公司;甘氨酸 分析纯,北京博奥拓科技有限公司;EDTA、尿素 分析纯,西陇化工股份有限公司; β -巯基乙醇 分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;乙醇 分析纯,天津市登封化学试剂厂。

Nano-ZS90 激光粒度仪 英国马尔文仪器有限公司;日立 SU8010 扫描电子显微镜 日本日立公司;RF-5301 pc 荧光分光光度计 日本岛津仪器公司;Spectrum Two 傅里叶红外光谱 美国珀金埃尔默股份有限公司;TG16-WS 型台式高速离心机 上海卢湘仪离心机仪器有限公司;Chirascan plus 圆二色谱仪 英国应用物理有限公司;UV-5200 紫外可见分光光度计 上海元析仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 鸡蛋预处理及蛋清液制备 新鲜鸡蛋脱壳后分离蛋黄、蛋清膜及系带,120 目筛过滤剔除蛋清液中杂质;根据前期实验结果,使用去离子水将蛋清液蛋白质浓度稀释至 8%,室温下磁力搅拌器 400 r/min 搅拌 30 min,使其成为均一的流体状态;柠檬酸调节 pH 至 7.4 ℃ 冷藏备用。

1.2.2 蛋清蛋白热诱导凝胶的制备 参考张根生等^[1]的方法并略作修改,具体制备工艺如下:天然蛋清蛋白热诱导凝胶(EWP)制备:预处理蛋清液置于 90 ℃ 水浴锅中反应 30 min 后诱导成凝胶,冰浴降温,4 ℃ 冷藏备用。超高压处理蛋清蛋白热诱导凝胶(UHP-EWP)制备:预处理蛋清液经 200 MPa 下高压处理 5 min 后热诱导成凝胶。TG 酶处理蛋清蛋白热诱导凝胶(TG-EWP)制备:蛋清液中添加 11 U/g TG 酶,50 ℃ 反应 2 h 后热诱导成凝胶。超高压协同 TG 酶处理蛋清蛋白热诱导凝胶(UTG-EWP)制备:蛋清液 300 MPa 下高压处理 5 min,添加 11 U/g TG 酶,45 ℃ 反应 1.5 h 后热诱导成凝胶。

1.2.3 凝胶质构特性分析 将蛋清蛋白凝胶切成 10 mm×10 mm×10 mm 大小,使用 P/36R 探头进行质构分析,测定凝胶的硬度及弹性。设置参数为:测前速 2 mm/s;测试速度 1 mm/s;测后速度 2 mm/s;压缩比例 50%;触发点负载 5 g;两个压缩循环间隔 5 s,每个样品平行测 3 次^[10]。

1.2.4 凝胶保水性分析 离心管质量记为 m_0 ,称取 0.5 g 左右样品于离心管中记为 m_1 ,10000 r/min

离心 15 min 后用滤纸吸取样品表面多余水分,称量离心管+剩余样品质量记为 m_2 ,每个样品平行测定 5 次。根据如下公式计算蛋清蛋白凝胶持水率:

$$\text{持水率}(\%) = \frac{m_2 - m_1}{m_1 - m_0} \times 100 \quad \text{式 (1)}$$

1.2.5 凝胶分子作用力测定 准确称取 0.5 g 凝胶,分别加入具有破坏不同作用力的试剂,用考马斯亮蓝 G250 作为指示剂,在 $A_{595} \text{ nm}$ 下测定其吸光度,并计算其蛋白溶解浓度^[11]。

1.2.6 凝胶傅里叶红外光谱测定 准确称取 2~3 mg 蛋清蛋白凝胶冻干粉样品进行压片,利用 FTIR 仪收集样品的红外图谱,参数设置为:波长范围 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$,分辨率 4 cm^{-1} ,温度 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$,每个样品扫描 3 次^[12]。

1.2.7 凝胶圆二色谱测定 将蛋清蛋白凝胶冻干粉粉末用去离子水稀释至 0.2 mg/mL ,参数设置为:温度 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、扫描范围 $190 \sim 250 \text{ nm}$ 、扫描速度 50 nm/s 、分辨率 0.0005 mdeg ,每个样品扫描 3 次^[13]。并通过结构分析网站计算蛋白质二级结构含量(<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk>)。

1.2.8 凝胶粒径及 Zeta 电位测定 采用马尔文激光粒度仪进行平均粒径和 Zeta 电位测定,将蛋清凝胶冻干粉粉末溶解在 PBS 缓冲液中,浓度稀释至 1 mg/mL 以下,经 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤,在 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下测量三次^[14-15]。

1.2.9 凝胶巯基含量测定 游离巯基含量的测定:将 0.01 g 左右凝胶样品溶解在 4 mL Tris-Gly 缓冲溶液中,室温下温育 30 min , 10000 r/min 离心 10 min 后取上清液。取 3 mL 上清液加入 0.04 mL Ellman 试剂, $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光反应 20 min 。以 3 mL Tris-Gly 缓冲溶液为空白,测定上清液 $A_{412} \text{ nm}$ 。根据以下公式计算游离巯基含量^[16]。

$$\text{游离巯基含量}(\mu\text{mol/g}) = \frac{A_{412} \times D \times 75.53}{C} \quad \text{式 (2)}$$

式中:75.53-Ellman 试剂的摩尔消光系数;D-稀释倍数;C-样品浓度(mg/mL)。

总巯基含量测定:用 $\beta\text{-ME-Urea-Tris-Gly}$ 缓冲液替代 Tris-Gly 缓冲液重复上述方法分别测定上清液 $A_{412} \text{ nm}$,并上述公式计算总巯基含量。

1.2.10 凝胶表面疏水性测定 采用荧光探针法测定蛋清蛋白凝胶表面疏水性,使用 8-苯胺-1-萘磺酸(ANS)作为探针。将 $20 \mu\text{L}$ ANS 工作液加入到 4 mL 蛋白凝胶溶液(浓度为 $1 \sim 5 \text{ mg/mL}$)中,漩涡混匀,室温避光反应 20 min 后测其荧光强度,表面疏水性用荧光强度对蛋白质浓度曲线的初始斜率表示。实验参数设置为:激发波长 390 nm ,狭缝 5 nm ,扫描范围为 $420 \sim 600 \text{ nm}$ ^[17]。

1.2.11 凝胶扫描电镜测定 将蛋清凝胶切为 $2 \times 5 \text{ mm}$ 的小条,冷冻干燥后随机选取蛋白凝胶样品固

定在样品台上,喷金,进行扫描电镜观察,电压 2 kV ,放大倍数为 10000 倍,观察凝胶的微观结构^[18]。

1.3 数据处理

使用 SPSS 19.0 软件 Duncan's 法分析显著性,数据采用平均值 $\pm$ 标准偏差表示,以 $P < 0.05$ 表示差异显著;使用 Origin 2018 软件制图。

2 结果与分析

2.1 蛋清蛋白凝胶质构性能分析

通过对蛋清蛋白凝胶的质构特性进行测定来评价其凝胶性能的变化。硬度和弹性是描述凝胶性的重要参数。由图 1 知,EWP、UHP-EWP、TG-EWP、UTG-EWP 的凝胶硬度从 1505.48 g/cm^2 分别上升至 1810.50 、 2024.52 、 2414.45 g/cm^2 ,凝胶弹性由 0.67 g/cm^2 上升至 0.84 、 0.93 、 0.96 g/cm^2 ,说明在改性作用下,蛋清凝胶的性能显著提高($P < 0.05$)。吕静等^[19]的研究发现高压作用能够显著提升凝胶的硬度和弹性。超高压能够促使蛋清蛋白结构展开,分子内部包埋的疏水基团和-SH 基团等活性基团暴露出来,在热诱导凝胶过程中该基团有利于分子间疏水相互作用和二硫键的形成,形成结构更加致密的结构,宏观上表现为凝胶硬度及弹性的提高^[20]。TG 酶使蛋白质分子加速聚集,大分子聚合物促使了凝胶体系形成了更为致密均匀的凝胶三维网络结构。UTG-EWP 组高于单一处理的原因,可能是由于蛋清蛋白结构的适度展开,增加了蛋白质与 TG 酶的结合位点,相互交联增强,形成了硬度、弹性较大的凝胶,凝胶稳定性显著增强。这与刘勤华^[9]的研究结论类似。

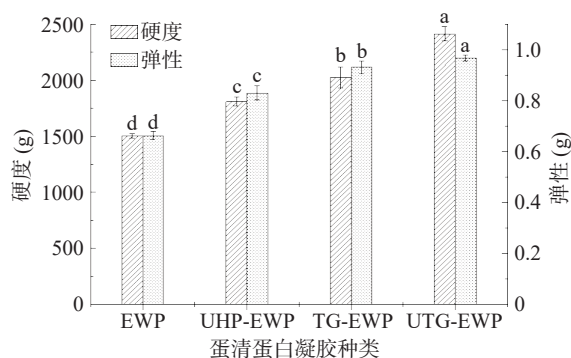


图 1 EWP、UHP-EWP、TG-EWP、UTG-EWP 硬度及弹性变化

Fig.1 Hardness and elasticity changes of EWP, UHP-EWP, TG-EWP, UTG-EWP

注:图中不同字母表示两组间具有显著差异($P < 0.05$),图 2~图 3、图 6~图 8 同。

2.2 蛋清蛋白凝胶保水性分析

持水率是影响凝胶品质的重要评价指标,不仅能反映凝胶网络中截留水的能力,也反映了凝胶网络结构中蛋白质与水的相互作用^[21]。由图 2 知,EWP、UHP-EWP、TG-EWP、UTG-EWP 的持水率分别为 70.80% 、 75.91% 、 80.52% 、 87.83% ,凝胶持水率显著升高($P < 0.05$)。这可能是由于在改性处理下凝胶空

间网络结构逐渐致密,对水分的截留能力增强。Bagher 等^[22]研究了 TG 酶对红罗非鱼鱼糜凝胶特性的影响,添加 0.30 U/g TG 酶时,鱼糜蛋白交联度提高,网络结构致密,鱼糜的持水力提高。Chang 等^[23]发现,蛋白质分子通过氢键、分子偶极、瞬间偶极、诱导偶极等作用力结合大量水分,从而形成难以自由运动的大分子聚合物,这可能与凝胶化过程中的分子作用力有关。

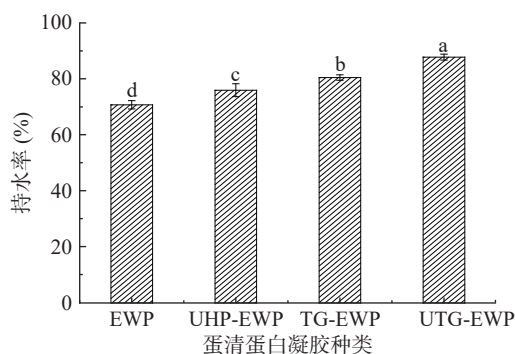


图2 EWP、UHP-EWP、TG-EWP、UTG-EWP 持水率变化
Fig.2 Changes in water holdup of EWP, UHP-EWP, TG-EWP and UTG-EWP

2.3 蛋清蛋白凝胶分子作用力分析

影响蛋清蛋白凝胶化的作用力主要分为蛋白质分子内作用力(范德华力和空间相互作用)和分子间作用力(离子键、氢键、疏水相互作用和二硫键)^[11]。凝胶的形成特性主要受离子键、氢键、疏水相互作用和二硫键变化的影响,从而引起蛋白质聚集形成凝胶网络。由图3可知,在蛋清蛋白凝胶化过程中,疏水相互作用是维持凝胶结构的主要作用力,二硫键次之,氢键和离子键贡献较小。四组凝胶的离子键含量均较低,略有上升,说明离子键不是维持蛋清蛋白凝胶空间网络结构的主要作用力。与对照组 EWP 相比,氢键含量显著($P<0.05$)减少,氢键是维持二级结构的主要作用力,经过改性处理蛋白质分子结构展开,氢键断裂, α -螺旋转化为对凝胶结构更有利的 β -折叠结构,与2.5中 α -螺旋和 β -折叠变化趋势一致;

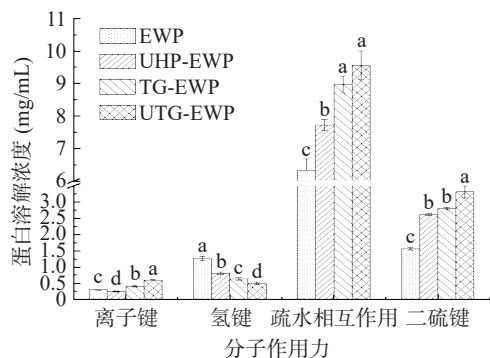


图3 EWP、UHP-EWP、TG-EWP、UTG-EWP FTIR 分子作用力变化

Fig.3 Molecular force changes of EWP, UHP-EWP, TG-EWP, and UTG-EWP FTIR

疏水相互作用力显著($P<0.05$)提高,说明在改性过程中,超高压作用下蛋白质分子内部包埋的疏水基团随之暴露出来,疏水相互作用力重新连接蛋白质分子,更易形成凝胶网络结构的大分子聚集体。He 等^[24]研究了超高压改性油菜籽凝胶,研究表明蛋白质分子间的疏水相互作用是形成蛋白凝胶的关键因素之一。TG 酶与蛋清蛋白发生交联,提高了聚集体的分子量,大分子聚集体分子内和分子间都通过疏水相互作用连接^[5]。二硫键逐渐升高是由于分子内部的巯基暴露出来氧化生成的,也是维持凝胶结构的主要作用力。UTG-EWP 组较 UHP-EWP 和 TG-EWP 组变化更为显著($P<0.05$),可能是由于高压作用下蛋白质分子结构适度打开,为 TG 酶的交联提供更多结合位点,改性效率更高,在离子键、氢键、疏水相互作用和二硫键的共同作用下,蛋清蛋白凝胶强度和稳定性显著提高,形成结构更为致密的凝胶网络。这与王炳智^[7]的结论类似。

2.4 蛋清蛋白凝胶傅里叶红外光谱分析

通过傅里叶红外光谱分析探究蛋白质二级结构变化,蛋白质光谱的特征吸收峰有酰胺 I 带($1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$)和酰胺 II 带($1480\sim 1575\text{ cm}^{-1}$)等,都与蛋白质的二级结构有关。蛋白质分子内多肽链可形成 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角以及无规则卷曲等特定的二级结构。蛋清蛋白改性前后的峰形和峰位大致相同,说明超高压处理和 TG 酶处理没有改变蛋清蛋白的功能基团,也没有引入或生成新的功能基团^[25]。由图4知,四组蛋清凝胶在 3270 cm^{-1} 附近均有一个明显的吸收峰, $2900\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ 处的峰是-OH 和氢键拉伸振动的特征吸收峰,酰胺 A 带代表了氢键的存在,氢键是提高蛋白凝胶强度的重要因素之一。 1650 cm^{-1} 附近均有一个明显的吸收峰, EWP、UHP-EWP、TG-EWP、UTG-EWP 该峰的波值分别为 1651 、 1648 、 1645 、 1646 cm^{-1} , 酰胺 I 带主要是由 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动引起的,反映了蛋白质结构的舒展程度,蛋白质结构的展开使部分氢键断裂,导致 α -螺旋含量减少。在 1520 cm^{-1} 附近均有一个明显的吸收峰,

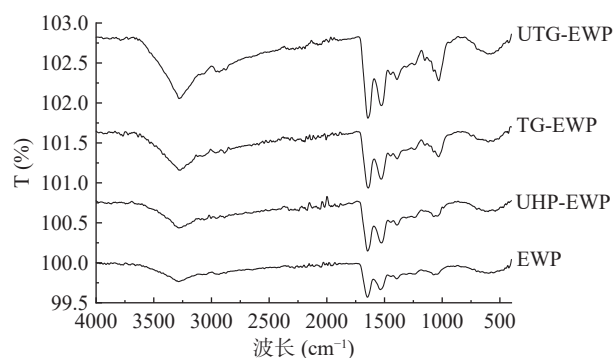


图4 EWP、UHP-EWP、TG-EWP、UTG-EWP FTIR 谱图变化

Fig.4 Changes of EWP, UHP-EWP, TG-EWP, and UTG-EWP FTIR spectrum

EWP、UHP-EWP、TG-EWP、UTG-EWP 该峰的波值分别为 1524、1522、1525、1515 cm^{-1} , 改性组与对照组 EWP 相比发生了不同程度的蓝移, β -折叠含量升高。酰胺 II 带代表 N-H 弯曲和 C-N 收缩, 分子内部的氢键发生重组以及内部活性基团暴露, 导致 β -折叠含量增加^[26]。这与 Zhang 等^[27]的研究结果一致。

2.5 蛋清蛋白凝胶圆二色谱分析

利用圆二色光谱分析蛋清蛋白二级结构的变化, 由图 5 可知, 蛋清蛋白凝胶在 190 nm 左右均出现明显的正峰谱带, 该特征峰为 α -螺旋和 β -折叠的重合峰。表明二级结构中富含 α -螺旋和 β -折叠。在 200~202 nm 之间为光谱的零交叉点, 200~240 nm 范围内有一条宽负带, 证明了蛋清蛋白凝胶中都富含 β -折叠结构, 与红外光谱结论一致。

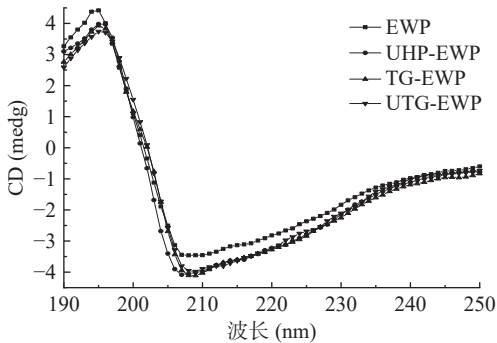


图 5 EWP、UHP-EWP、TG-EWP、UTG-EWP 圆二色谱图变化
Fig.5 Changes of EWP, UHP-EWP, TG-EWP, and UTG-EWP Circular dichromogram

通过结构分析网站计算蛋白质二级结构相对含量百分比, 详见表 1。与 EWP 对照组相比, UHP-EWP、TG-EWP、UTG-EWP 组 α -螺旋含量显著 ($P<0.05$) 下降至 21.52、17.80、13.33%, β -折叠含量上升至 44.17%、44.62%、47.10%。 α -螺旋结构主要依靠氢键的维持, 蛋白质结构部分打开, 氢键被破坏, 所以 α -螺旋含量降低。暴露的氢键会随着大分子链的聚集而重组, β -折叠含量升高, Momen 等^[28]研究发现 β -折叠与蛋白质的聚集状态有关, β -折叠占比增大表明蛋白质聚集度越高, 结构更加稳定。Huang 等^[29]研究发现加热处理也会导致 α -螺旋减少, β -折

表 1 EWP、UHP-EWP、TG-EWP、UTG-EWP FTIR 二级结构含量变化

蛋清蛋白 凝胶种类	二级结构(%)			
	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规卷曲
EWP	24.29±0.95 ^a	42.42±0.99 ^c	24.16±0.72 ^c	9.13±0.46 ^b
UHP-EWP	21.52±0.75 ^b	44.17±0.48 ^b	24.91±0.31 ^{bc}	9.41±0.70 ^b
TG-EWP	17.80±0.97 ^c	44.62±0.49 ^b	25.17±0.41 ^b	12.40±0.10 ^a
UTG-EWP	13.33±0.92 ^d	47.10±0.47 ^a	27.23±0.35 ^a	12.33±1.64 ^a

注: 不同小写字母表示同列数据差异显著, $P<0.05$ 。

叠增多。UTG-EWP 较 UHP-EWP、TG-EWP 变化更加显著, 这可能是超高压处理促进了蛋白质的有序结构适度打开, 更有利于 TG 与蛋清蛋白发生交联形成更大的聚集体。

2.6 蛋清蛋白凝胶平均粒径及 Zeta 电位分析

由图 6(a)可知, 与对照组 EWP 相比, UHP-EWP 平均粒径值显著 ($P<0.05$) 下降, 这可能由于凝胶的有序结构在超高压作用的空穴效应、强剪切力作用下被破坏, 在所施加的机械力产生随机破裂、解聚等作用下^[30], 形成了小分子颗粒蛋白, 平均粒径减小; TG-EWP 平均粒径显著 ($P<0.05$) 上升, 经 TG 酶催化, 蛋清蛋白分子间发生交联, 蛋白质分子变性聚集, 粒径增加, 增强了空间位阻, 有利于凝胶网络的形成; UTG-EWP 组略小于 TG-EWP 组, 显著 ($P<0.05$) 高于 UHP-EWP 组, 说明在二者协同作用下, TG 酶的交联作用影响显著。先经过超高压作用使蛋清凝胶中大分子蛋白结构被破坏, 小分子增加, 再经过 TG 酶交联, 凝胶中小分子蛋白分散均匀, 体系更加稳定, 平均粒径上升。

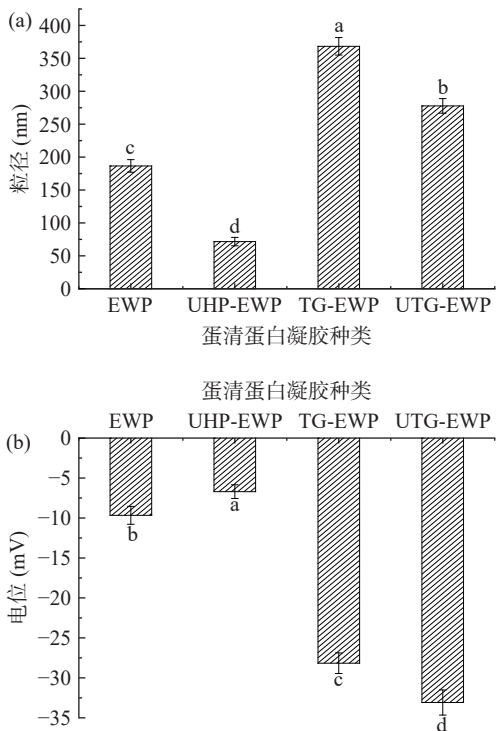


图 6 EWP、UHP-EWP、TG-EWP、UTG-EWP 平均粒径(a) 和 Zeta 电位(b)变化

Fig.6 Changes in the mean particle size (a) of EWP, UHP-EWP, TG-EWP, UTG-EWP, and Zeta potential (b)

Zeta 电位可表示离子键变化, 高 Zeta 电位绝对值代表蛋白质凝胶体系稳定, 而低 Zeta 电位绝对值蛋白质易发生絮凝或凝聚^[31]。由图 6(b)可知, UHP-EWP 组 Zeta 电位绝对值较 EWP 组略微降低, 可能是由于适当的压力作用下, 蛋白质分子内部包埋的疏水基团暴露, 与蛋白表面带负电荷的氨基酸中和, Zeta 电位值绝对值下降, 而疏水作用力有利于凝胶

化的形成,凝胶强度微弱提升;TG-EWP组较EWP组显著($P<0.05$)提升,在TG酶交联作用下,蛋清蛋白热凝胶化时,Zeta电位绝对值升高,蛋白质迅速聚集成大分子聚合物,空间变大,具有更多负电荷,有利于与水分子的结合,能够提高凝胶的硬度和持水力^[32];UTG-EWP组较UHP-EWP组较显著提升,较TG-EWP组略微提升,证明在复合作用中TG的交联作用显著,且在高压作用下,蛋白质结构适度打开,有利于TG酶与蛋白质分子结合,离子键作用提高,凝胶网状结构孔径变小,凝胶体系致密均一,进而提高凝胶结构和弹性^[33]。

2.7 蛋清蛋白凝胶游离巯基含量及总巯基含量分析

通过测定巯基含量的变化趋势来分析蛋白质三级结构的变化。二硫键(-S-S-)和巯基(-SH)能够维持蛋白质分子的空间构象,对蛋白质的凝胶性能起到显著的作用^[34]。巯基包括蛋白质表面的游离巯基和包埋在蛋白质分子内部的巯基,巯基和二硫键的相互转化,能够引起凝胶性能的变化。由图7可知,EWP对照组中游离巯基含量为 $0.71\text{ }\mu\text{mol/g}$,总巯基含量为 $49.51\text{ }\mu\text{mol/g}$,这与赵伟等^[35]的研究结论相近。与对照组相比,UHP-EWP、TG-EWP、UTG-EWP三组的游离巯基含量均显著($P<0.05$)上升,分别上升至 12.21 、 13.83 、 $17.26\text{ }\mu\text{mol/g}$;总巯基含量均不同程度下降,分别下降至 36.81 、 35.47 、 $31.37\text{ }\mu\text{mol/g}$ 。超高压处理后蛋清蛋白分子变性,内部结构展开,巯基暴露,所以游离巯基含量上升,凝胶性能在分子相互作用下不断提升。游离巯基含量不断增多,巯基逐渐交联生成二硫键,总巯基含量下降。有研究称, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上的热处理对二硫键的交联也有增益作用^[36]。TG酶处理下蛋清蛋白分子与TG酶通过二硫键等作用力发生交联,分子结构发生变化,巯基含量变化也符合上述趋势。超高压协同TG酶作用下的蛋清蛋白凝胶性能的提升均大于单一改性,可能是由于超高压作用增强了TG酶与蛋清蛋白的作用程度,超高压后的分子结构有利于TG酶与蛋清蛋白进行交联,巯基更多的生成二硫键,总巯基含量下降显著,二硫

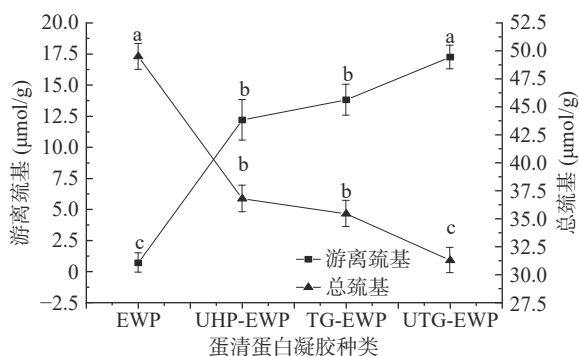


图7 EWP、UHP-EWP、TG-EWP、UTG-EWP游离巯基及总巯基含量变化比较

Fig.7 Comparison of the changes of free and total sulfhydryl EWP, UHP-EWP, TG-EWP, UTG-EWP

键对凝胶网络结构的形成有促进作用,凝胶性能随之大幅改善。

2.8 蛋清蛋白凝胶表面疏水性分析

表面疏水性(S_0)通过蛋白质的疏水基团与水性介质中的极性基团接触数量来表示,是蛋白质聚集形成的重要条件和反映蛋白质变性程度的指标,并且与蛋白凝胶性密切相关^[37]。芳香族氨基酸暴露于水溶液中,与ANS荧光探针结合,展现出更强的表面疏水性。由图8可知,改性后的蛋清蛋白凝胶表面疏水性显著($P<0.05$)高于EWP对照组,超高压作用改变了蛋清蛋白的空间结构,暴露了更多的疏水区域,蛋白质分子的表面疏水性增强,这与张铁华等^[38]的结论一致;经TG酶处理的蛋清蛋白凝胶表面疏水性升高,可能是由于TG酶与蛋清蛋白分子的交联作用,蛋白质分子结构展开,二硫键断裂,包埋在蛋清蛋白内部的疏水基团暴露,表面疏水性升高;UTG-EWP组较单一处理的EWP均显著($P<0.05$)提高,表明超高压处理的机械力和空化作用与TG酶交联作用相互协同,其中超高压的作用更为显著。蛋清蛋白的致密结构展开,疏水基团暴露,TG酶与蛋清蛋白分子高效结合,凝胶性能显著提升,这与分子作用力结论和质构性能一致。

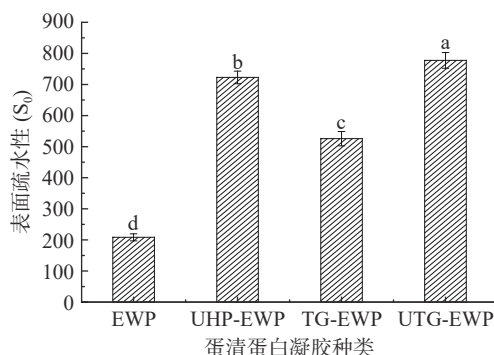


图8 EWP、UHP-EWP、TG-EWP、UTG-EWP表面疏水性变化比较

Fig.8 Comparison of the surface hydrophobicity changes of EWP, UHP-EWP, TG-EWP, and UTG-EWP

2.9 蛋清蛋白凝胶微观结构分析

图9反映了不同改性作用下蛋清蛋白凝胶的网络结构变化。蛋白凝胶微观结构的变化会影响其质构特性及持水性,主要反应在微观结构的结构平整程度、致密程度、孔洞大小等。由图9可知,EWP凝胶蛋白网络结构疏松,具有不规则的孔洞,凝胶表面不平整,UHP-EWP、TG-EWP与EWP相比结构均更加致密光滑,孔洞缩小,平整度提高,可能是由于超高压作用下蛋白结构打开,分子内部的疏水基团暴露出来,有利于蛋清蛋白胶凝化;在TG酶的催化下,蛋清蛋白交联程度增加, ϵ -(γ -谷氨酰基)赖氨酸异肽键形成增多,促进了蛋白凝胶的致密结构的形成^[39]。以上可以得出超高压与TG酶均能不同程度地提高蛋清蛋白的凝胶性的结论;UTG-EWP组较对照组EWP

微观网络结构有明显改善, 较 UHP-EWP 与 TG-EWP 均有提高。超高压作用下蛋白质结构打开, 降低了蛋白分子之间的相互作用, 暴露出更多的疏水基团和巯基等活性基团, 更高效与 TG 酶发生交联作用, 复合改性作用下凝胶的微观结构更加致密光滑, 整体光滑平整, 凝胶网络更为均匀, 致密结构使改性蛋清蛋白凝胶具有更好的凝胶性能, 这与质构的结论一致。

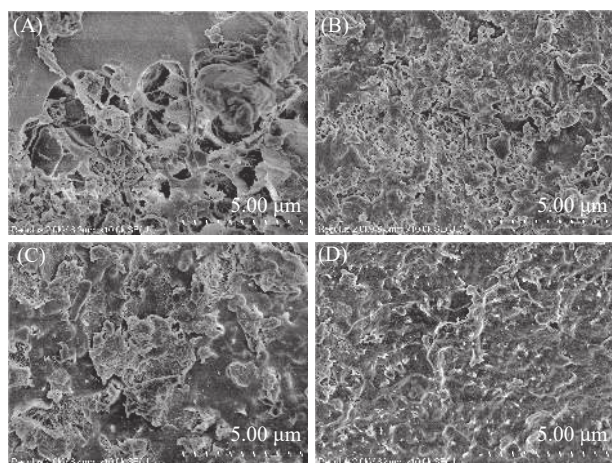


图 9 EWP、UHP-EWP、TG-EWP、UTG-EWP 微观结构变化比较

Fig.9 Comparison of the microstructures of EWP, UHP-EWP, TG-EWP, and UTG-EWP

注: A: EWP 扫描电镜图; B: UHP-EWP 扫描电镜图; C: TG-EWP 扫描电镜图; D: UTG-EWP 扫描电镜图。

3 结论

超高压作用下蛋清蛋白分子内部结构展开, 内部疏水基团暴露, 蛋白质分子能够在疏水相互作用下与 TG 酶高效结合, 形成了结构稳定并且能够截留大部分水分子的网状结构, 从而改善了蛋清蛋白的凝胶性能。通过研究蛋清蛋白空间结构的变化可知: 超高压改性及 TG 酶改性均能在不同程度上提高蛋清蛋白凝胶的稳定性, 而二者协同处理改性效率显著提高。但是需要注意对改性程度的把控, 避免对蛋白质产生不利影响。超高压协同 TG 酶处理改性蛋清蛋白的凝胶性具有广阔应用前景, 需要进一步的深入研究。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

[1] 张根生, 徐旻梦, 刘欣慈, 等. 湿法糖基化改性对蛋清蛋白凝胶特性及微观结构的影响[J]. 食品工业科技, 2023, 44(6): 105-112. [ZHANG Gensheng, XU Yimeng, LIU Xinci, et al. Effect of wet glycosylation modification on gel properties and microstructure of egg white protein[J]. Food Industry Science and Technology, 2023, 44(6): 105-112.]

[2] 叶钰, 高金燕, 陈红兵, 等. 超声波加工对蛋清蛋白质结构和凝胶特性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(21): 45-52. [YE Yu, GAO Jinyan, CHEN Hongbing, et al. Effect of ultrasonic process-

ing on the protein structure and gel properties of egg white[J]. Food Science, 2018, 39(21): 45-52.]

[3] 王辉. 蛋清蛋白动态超高压微射流改性研究及机理初探[D]. 南昌: 南昌大学, 2007. [WANG Hui. Study on the modification of microjet and its mechanism[D]. Nanchang: Nanchang University, 2007.]

[4] IAMETTI S, DONNIZZELLI E, PITTIA P, et al. Characterization of high-pressure-treated egg albumen[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(9): 3611-3616.

[5] 王然, 迟玉杰. 转谷氨酰胺酶提高蛋清粉凝胶性能的研究[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(2): 109-113. [WANG Ran, CHI Yujie. Improving the gel performance of egg white powder by transglutaminase[J]. Food and Fermentation Industry, 2010, 36(2): 109-113.]

[6] 陈杰. 高凝胶性蛋清蛋白粉生产技术研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2008. [CHEN Jie. Research on the production technology of high-gel egg white protein powder[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2008.]

[7] 王炳智. 高压与 TG 酶处理对小麦面筋蛋白的凝胶性影响研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2019. [WANG Bingzhi. Effect of gelation of high pressure and TG enzyme treatment on wheat gluten protein[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2019.]

[8] 才卫川, 张坤生, 任云霞. TG 酶协同超高压处理对鸡胸肉中肌原纤维蛋白凝胶品质的影响[J]. 食品工业科技, 2014, 35(23): 77-83. [CAI Weichuan, ZHANG Kunsheng, REN Yunxia. Effect of TG enzyme on myofibrillin gel quality in chicken breast[J]. Food Industry Technology, 2014, 35(23): 77-83.]

[9] 刘勤华. 高压处理对含有 TG 酶的鸡胸肉凝胶理化性质的影响[J]. 肉类工业, 2022(8): 29-33. [LIU Qinhua. Effect of high-pressure treatment on the physicochemical properties of chicken breast gel containing TG enzyme[J]. Meat Industry, 2022(8): 29-33.]

[10] LI J H, ZHANG M Q, CHANG C H, et al. Molecular forces and gelling properties of heat-set whole chicken egg protein gel as affected by NaCl or pH[J]. Food Chemistry, 2018, 261: 36-41.

[11] ABDELHEDI O, JEMIL I, NASRI R, et al. Molecular forces study and microstructure and gelling properties of smooth hound protein gels prepared by heat-induced gelation process: Effect of pH variation on textural and functional properties[J]. Process Biochemistry, 2016, 51(10): 1511-1520.

[12] SUN G H, CHI W R, ZHANG C J, et al. Developing a green film with pH-sensitivity and antioxidant activity based on κ -carrageenan and hydroxypropyl methylcellulose incorporating *Prunus maackii* juice[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 94: 345-353.

[13] LI J H, WANG C Y, ZHANG M Q, et al. Effects of selected phosphate salts on gelling properties and water state of whole egg gel[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 77: 1-7.

[14] 田朝杰, 孙婵婵, 陈宁, 等. 主成分分析在蛋清蛋白基脂肪模拟物综合评价中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(4): 69-74. [TIAN Chaojie, SUN Chanchan, CHEN Ning, et al. Application of principal component analysis in the comprehensive evaluation of egg-white protein-based fat mimetics[J]. Food and Fermentation Industry, 2016, 42(4): 69-74.]

[15] DJOULLAH A, KRECHICHE G, HUSSON F, et al. Size measuring techniques as tool to monitor pea proteins intramolecular crosslinking by transglutaminase treatment[J]. Food Chemistry, 2016, 190: 197-200.

[16] WANG B L, WANG P, XU X L, et al. Structural transformation of egg white protein particles modified by preheating combined

- with pH-shifting: Mechanism of enhancing heat stability[J]. *LWT*, 2022, 170: 114.
- [17] XU Y Y, WANG G R, WANG X B, et al. Effects of homogenization on the molecular flexibility and emulsifying properties of soy protein isolate[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2018, 27(5): 1293.
- [18] FANG M X, XIONG S B, HU Y, et al. *In vitro* pepsin digestion of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi gels after cross-linking by Microbial Transglutaminase (MTGase)[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 95: 152–160.
- [19] 吕静, 刘亚平, 党润卿, 等. 不同压力条件下蛋清蛋白结构和凝胶性的比较分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(6): 46–53. [LÜ Jing, LIU Yaping, DANG Runqing, et al. Comparative analysis of the structure and gelation of egg white proteins under different pressure conditions[J]. *Modern Food Technology*, 2020, 36(6): 46–53.]
- [20] 张根生, 刘欣慈, 岳晓霞, 等. 超高压和巴氏杀菌对蛋清蛋白结构及起泡性能的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(1): 119–126. [ZHANG Gensheng, LIU Xinci, YUE Xiaoxia, et al. Effect of ultra-high pressure and pasteurization on egg white protein structure and foaming properties[J]. *Food Science*, 2022, 43(1): 119–126.]
- [21] MAISSA K, HAMADI A, ALI A M. The effect of pH, sucrose, salt and hydrocolloid gums on the gelling properties and water holding capacity of egg white gel[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 87: 11–19.
- [22] BAGHER S F Z, JAMILAH B, NAZAMID S, et al. Thermal and physicochemical properties of red tilapia (*Oreochromis niloticus*) surimi gel as affected by microbial transglutaminase[J]. *Animal Production Science*, 2017, 57(5): 993–1000.
- [23] CHANG K F, JIANG W, LIU J B. Effect of subcritical water treatment on the structure and foaming properties of egg white protein[J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 124: 107–241.
- [24] HE R, HE H Y, CHAO D, et al. Effects of high pressure and heat treatments on physicochemical and gelation properties of rapeseed protein Isolate[J]. *Food & Bioprocess Technology*, 2014, 7(5): 1344–1353.
- [25] 李政翰. 玉米淀粉-脂肪酸-带鱼肌球蛋白间的相互作用机制研究[D]. 锦州: 渤海大学, 2020: 30–35. [LI Zhenghan. Mechanism of the interaction between maize starch-fatty acid-hairtail myosin[D]. Jinzhou: Bohai University, 2020: 30–35.]
- [26] WANG Z J, LI Y, JIANG L Z, et al. Relationship between secondary structure and surface hydrophobicity of soybean protein isolate objected to heat treatment[J]. *Journal of Chemistry*, 2014, 2014(5): 1–10.
- [27] ZHANG Z, LI Y, LEE M C, et al. The impact of high-pressure processing on the structure and sensory properties of egg white-whey protein mixture at acidic conditions[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2020, 13(2): 379–389.
- [28] MOMEN S, SALAMI M, ALAVI F, et al. The techno-functional properties of camel whey protein compared to bovine whey protein for fabrication a model high protein emulsion[J]. *LWT*, 2019, 101: 543–550.
- [29] HUANG Y C, GUO L P, XIONG S L, et al. Property and structure changes of myofibril protein in pork treated by high pressure combined with heat[J]. *Food Science and Technology International*, 2016, 22(7): 647–662.
- [30] WANG T, SUN X H, RADDATZ J, et al. Effects of microfluidization on microstructure and physicochemical properties of corn bran[J]. *Journal of Cereal Science*, 2013, 58(2): 355–361.
- [31] 王静宇, 胡新, 刘晓艳, 等. 肌原纤维蛋白热诱导凝胶特性及化学作用力研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(8): 300–306. [WANG Jingyu, HU Xin, LIU Xiaoyan, et al. The properties and chemical force of myofibrillulin heat-induced gel[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2020, 46(8): 300–306.]
- [32] ZHANG Z Y, YANG Y L, TANG X Z, et al. Chemical forces and water holding capacity study of heat-induced myofibrillar protein gel as affected by high pressure[J]. *Food Chemistry*, 2015, 188: 111–118.
- [33] 杨玉玲, 周磊, 游远, 等. 氧化对肌原纤维蛋白热诱导凝胶结构特性及保水性的影响[J]. 中国农业科学, 2018, 51(18): 3570–3581. [YANG Yuling, ZHOU Lei, YOU Yuan, et al. Effect of oxidation on heat-induced gelsoler properties and water retention of myofibrillar proteins[J]. *Agricultural Science of China*, 2018, 51(18): 3570–3581.]
- [34] LIANG Y, KRISTINSSON H G. Structural and foaming properties of egg albumen subjected to different pH-treatments in the presence of calcium ions[J]. *Food Research International*, 2007, 40(6): 668–678.
- [35] 赵伟, 杨瑞金, 张文斌, 等. 高压脉冲电场作用下蛋清蛋白功能性质和结构的变化[J]. 食品科学, 2011, 32(9): 91–96. [ZHAO Wei, YANG Ruijin, ZHANG Wenbin, et al. Changes in functional properties and structure of egg Nmin under high voltage pulsed electric field[J]. *Food Science*, 2011, 32(9): 91–96.]
- [36] DU X, ZHAO M N, PAN N, et al. Tracking aggregation behaviour and gel properties induced by structural alterations in myofibrillar protein in mirror carp (*Cyprinus carpio*) under the synergistic effects of pH and heating[J]. *Food Chemistry*, 2021, 362: 130–222.
- [37] XUE H, ZHANG G W, HAN T F, et al. Improvement of gel properties and digestibility of the water-soluble polymer of tea polyphenol-egg white under thermal treatment[J]. *Food Chemistry*, 2022, 372: 131–319.
- [38] 张铁华, 殷涌光, 刘静波. 高压脉冲电场(PEF)对蛋清蛋白功能特性的影响[J]. 食品科学, 2007(9): 98–102. [ZHANG Tiehua, YIN Yongguang, LIU Jingbo. Effect of high-voltage pulsed electric field (PEF) on the functional properties of egg white protein[J]. *Food Science*, 2007(9): 98–102.]
- [39] 冯倩. 转谷氨酰胺酶改性对白鲢鱼肌原纤维蛋白凝胶特性及体外消化特性的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2023. [FENG Qian. Effect of transglutaminase modification on myofibrillin gel properties and in vitro digestion properties of silver carp[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2023.]